



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 43 18 692 A 1

51 Int. Cl.⁵:
G 01 N 33/559
G 01 N 33/50
G 01 N 33/53
G 01 N 21/84

21 Aktenzeichen: P 43 18 692.0
22 Anmeldetag: 4. 6. 93
43 Offenlegungstag: 20. 1. 94

DE 43 18 692 A 1

30 Innere Priorität: 32 33 31
06.06.92 DE 42 18 727.3

71 Anmelder:
Dittler, Ralph, Dipl.-Ing., 01309 Dresden, DE

74 Vertreter:
Ilberg, R., Dipl.-Ing. Pat.-Ing., Pat.-Anw., 01324
Dresden

72 Erfinder:
gleich Anmelder

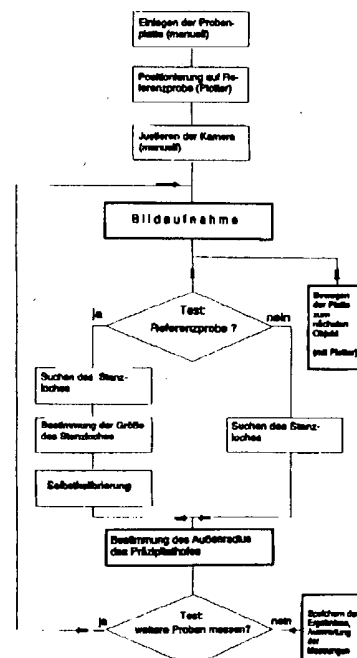
Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur Untersuchung von antigenhaltigen Blutserumproben

57 Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Untersuchung von antigenhaltigen Blutserumproben, die in Stanzlöcher einer antiserumhaltigen Gelplatte zwecks Bildung von Präzipitatrings infolge Radial-Immundiffusion eingebracht wurden. Jedes genau eine Probe (Referenzprobe, zu untersuchende Probe) enthaltende Plattenfeld wird elektronisch abgebildet, als Grauwert-Matrix abgelegt und softwaremäßig ausgewertet, wobei die Auswertung der Abbildungen folgende Schritte umfaßt:

a) Suchen des Stanzloches innerhalb der Abbildung mit Hilfe einer lageveränderlichen Maske (Kreis) - sowie ggf. dessen Größenbestimmung durch Größenveränderung der Maske (Kreis) - bis zur größtmöglichen Deckung mit dem Stanzloch;

b) Bestimmung der Größe des Präzipitatrings durch Größen- und Lageänderung der Maske (Kreis) um das Stanzloch bis zur größtmöglichen Deckung mit dem Präzipitatrings und wobei eine Kalibrierung des Abbildungsmaßstabs mit Hilfe der erkannten Größe des Stanzloches erfolgt und die Größe der Präzipitatrings der zu untersuchenden Proben mit der Größe der Präzipitatrings der Referenzproben verglichen wird.



DE 43 18 692 A 1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Untersuchung von antigenhaltigen Blutserumproben mittels einfacher radialer Immundiffusion (RID).

Bei einem radialen Immundiffusions-Test wird antigenhaltiges Untersuchungsmaterial in Stanzlöcher einer etwa 1 mm dicken antikörperhaltigen Agarosegelschicht gefüllt, mit der eine Probenplatte präpariert ist. Bei der im Anschluß beginnenden Diffusion wandern die gelösten Antigene solange radial in die Umgebung der Stanzlöcher, bis im Äquivalenzbereich mit den Antikörpern ein Antigen-Antikörper-Immunkomplex als unlösliches, sichtbares Präzipitat ausfällt. Je höher die Antigenkonzentration der Probe ist, desto ein größerer Präzipitatring entsteht um das Stanzloch. Die Auswertung der Serumproben, d. h. die Quantifizierung des Antigens im Serum, kann somit über das bei geeigneten Verhältnissen meßbare Quadrat des Ringdurchmessers bzw. Durchmessers innerhalb des Präzipitatrings im Vergleich zu Standardproben vorgenommen werden.

Das Ausmessen der etwa 10 mm Durchmesser 10 mm großen Präzipitatringe erfolgt für gewöhnlich unter Vergrößerungsgeräten durch Fachpersonal. Dabei wird in der Regel mit einer Meßlupe jede Probe einzeln ausgemessen und deren Meßwert und Position notiert.

Nach der DE 31 19 269 A1 ist auch schon anstelle einer Meßlupe die Verwendung eines umgebauten Mikrofilm-Lesegerätes zum Ausmessen erwähnt worden.

Ähnlich arbeitet ein Gerät nach der US 4 021 200, in das eine scheibenförmige Gelplatte mit kreisförmig angeordneten Proben eingelegt wird. Die beleuchtete Platte kann durch einen durchsichtigen Deckel betrachtet werden. Mit einem motorisch verstellbaren Fadenzugpaar werden nacheinander die Durchmesser der Präzipitatringe visuell eingegrenzt und die Ergebnisse der Messung digital angezeigt. Die Meßwerte werden notiert.

Das Ausmessen wird jeweils erschwert durch eine relativ schlechte Bildqualität. So sind die Ringe kontrastarm und besitzen verschwommene sowie unregelmäßige, zusammenhanglose Konturen. Mitunter bilden sich auch regelrechte Ausläufer, wodurch es zu deutlichen Abweichungen von der idealen Kreisform kommt. Deshalb führt die Auswertung zu stark subjektiv gefärbten Ergebnissen. Hinzu kommen die üblichen Fehlerquellen visueller Meßtätigkeit, also Ables- und Notationsfehler. Nicht verschwiegen werden darf letztlich die starke Belastung der Augen bei permanenter Durchführung dieser Arbeiten.

Zur weiteren Auswertung müssen die notierten Meßwerte über eine Tastatur einem Rechner eingegeben werden, was wiederum Ables- und Eingabefehler in sich birgt.

Alles in allem sind die bekannten Methoden nicht sehr genau, ergonomisch belastend, zeitaufwendig und personalbindend (GIT Labormedizin 7-8/90, S. 362).

An sich liegt es nahe, die Messung und Auswertung mittels elektronischer Bildverarbeitungsverfahren zu automatisieren, zumal Verfahren zur photogrammetrischen Erfassung statischer Aufnahmeobjekte mittels opto-elektronischer Festkörper-Flächensensoren seit einiger Zeit bekannt sind. Bei einem solchen Verfahren (DE 38 11 837 A1) wird das Aufnahmeobjekt in geometrischen Bezug zu einem Raster gesetzt und beide digital abgespeichert. Ein kontrastreicher Randbereich des körperlich ausgedehnten Objekts wird durch entsprechende unterschiedlich fokussierte Teilbilder ange-

strebt.

Ein solches Verfahren läßt sich zur Messung der einfachen radialen Immundiffusion aber nicht anwenden.

Zum einen würde eine unterschiedliche Fokussierung zur Bestimmung der unscharfen Zonengrenzen nicht führen. Zum anderen würden Ausläufer oder Ausfransungen nicht unterdrückt werden. Zu bedenken sind weiterhin Störquellen, die durch Kratzer, Staub- und Schmutzpartikel, Beschriftungen oder Schlieren im Gel oder in der Probenplatte gebildet werden und im praktischen Betrieb unausbleiblich sind.

Nach der DE 40 13 180 A1 wird eine Testflüssigkeit zum Nachweis von Hämolyse dahingehend bildverarbeitend untersucht, ob durch sie ein auf eine Mikroplatte aufgemaltes Bild (Dreieck) anhand seiner Randschärfe erkannt wird oder durch Partikel in der Testflüssigkeit bezüglich eines Schwellenwertes unscharf und damit nicht relevant wird. Ein Ausmessen eines größenvariablen, gestörten Objekts erfolgt nicht.

Auch ein Verfahren, basierend auf einer Konturenverfolgung mittels Differenzieren der Bildinformationen nach der DE 40 40 726 A1 muß aufgrund der genannten Störungsvielfalt ausscheiden, da es zu völlig falschen bzw. nicht auszuwertenden Ergebnissen führen würde. Indem das Variationsverhältnis der Lichtintensität an den Grenzen des vorhandenen Musters gemessen wird, würden, gleichgültig, ob das Muster zu dem zu bestimmenden Objekt gehört oder zu Störungen, unvermeidlich Objektmißbildungen und Störobjekte in die Konturenbildung einbezogen werden.

Nach der US 4 794 450 ist eine Hochgeschwindigkeitsapparatur zum bildverarbeitenden Erkennen von Agglutinationsmustern für diagnostische Untersuchungen bekannt. Mehrere Hundert Proben werden analysiert, je nach Befund unterschiedlich gekennzeichnet ausgeplottet und das gewonnene Bild ausgewertet. Die Unterscheidung verschiedener Muster in störungsarmer Umgebung ist jedoch nicht Gegenstand der Erfindung.

Die erste mit der Erfindung zu überwindende Schwierigkeit ist die, daß bei den in Betracht kommenden Gelplatten die einzeln mit Hand eingebrachten Stanzlöcher zwar einen ausreichend exakten Durchmesser besitzen, aber ihre Lage pro Lochfeld nicht genau genug positioniert werden kann. Es kann zwar sichergestellt werden, daß je Lochfeld nur ein Stanzloch eingebracht ist, aber dieses kann sich an verschiedenen Orten innerhalb dieses Feldes befinden. Dieser Ort muß durch die Bildverarbeitung gefunden werden.

Als weitere Schwierigkeit kommen Störobjekte, wie Beschriftungen, Kratzer, Schlieren, Fingerabdrücke, Fremdpartikel und Risse im Gel hinzu. Sie lassen sich auch bei äußerster Behutsamkeit nicht zuverlässig vermeiden.

Drittens bilden die Bildpunkte, die zu der Probe gehören, nur im Idealfall einen konzentrischen, geschlossenen Ring um das Stanzloch im Gel. Wie die Praxis zeigt, sind von dieser Idealausbreitung mannigfache Abweichungen eher die Regel. Die Kreise sind eben nicht immer konzentrisch. Sie sind auch oft nicht geschlossen, sondern lediglich halbkreisartig. Die Kreisperipherie kann auch so aussehen, daß kleine, nicht zusammenhängende Teilkreisbögen vorhanden sind. Weiterhin treten Ausbeulungen auf, also Deformierungen der idealen Kreisform oder gar Ausbuchtungen, also kleine Fortsetzungen, die am Kreisrand hängen. Zusätzlich sind die Kreise von unterschiedlicher Qualität, sie sind mehr oder weniger verschwommen, kontrastarm und von